BEST AVAILABLE COPY

? S PN=DD 296075
S4 1 PN=DD 296075
? T 4/3,AB/1

4/3,AB/1
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009005596
WPI Acc No: 1992-132891/*199217*
XRAM Acc No: C92-062202
Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV - consist of an aminoacid amide such as L-isoleucine pyrrolide, -thiazide, prolinol or -thio prolinol
Patent Assignee: LUTHER-UNIV HALLE (UYHA-N)
Inventor: BARTH A; BORN I; DEMUTH H U; FAUST J; HEINS J; NEUBERT K; RAHFELD J U; STEINMETZ T
Number of Countries: 001 Number of Patents: 001
Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
DD 296075	A	19911121	DD 331544	A	19890807	199217	B

Priority Applications (No Type Date): DD 331544 A 19890807
Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 296075	A		7		

Abstract (Basic): DD 296075 A

The prepn. of new inhibitors of dipeptidyl peptidase (IV) comprises synthesising an aminoacid amide of formula A-B (I) from XAY or XA(Z)Y and B using conventional peptide chemistry methods for forming amide bonds, pref. the mixed anhydride method or active ester method.

The protecting gps. X and Y are removed with conventional w deblocking methods (acidolysis) and if necessary purifying by recrystallisation or column chromatography on Sephadex G10 or weakly acidic ion exchangers. In (I) A = an alpha-aminoacid of structure H2N-CHRCOOH in which R is an aliphatic, aromatic or heterocyclic gp. and is e.g. ala, val, leu, ser, thre, cys, methionine, pro, lys, arg, his, glutamic acid, glu, aspartic acid, asp, phenyl, tyr, tryptophan, norvaline, norleucine, ornithine, 2,4-diaminobutyric acid, alpha-aminobutyric acid, pref. isoleucine each in L configuration, alpha-aminosiobutyric acid and in the cases of trifunctional aminoacids, the cores. N or C omega or O or D substd. derivs. are in the L-config., esp. N omega-acyl, C omega or D-benzylamino acids; or A = an alpha- iminocarboxylic acid of structure (a), where n = 2,3 or 4 and is e.g. L-acetidine-2-carboxylic acid, L-proline, L-pipe-colonic acid and related cpds. such as L-3,4-dehydroproline, L-thioproline and the corresp. halo-, NO2, OH-, CN- lower opt. branched alkyl or alkoxy-substd. derivs. e.g. L-4-hydroxyproline; B = special heterocyclic amines or heterocyclic aminaldehydes; X = an alpha- amino protecting gp. conventionally used in peptide chemistry, pref. tert. butoxycarbonyl; Z = a side chain protecting gp. (depending on the structure of the trifunctional aminoacid) of the teter. butyl type (tert. butyloxycarbonyl, tert. butyl ester, O or S-tert butyl); X = OH, active ester pref. pentafluorphenyl or N-hydroxysuccinimide active ester pref. pentafluorphenyl or N-hydroxysuccinimide ester.

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 296 075 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 D 295/04
C 07 D 277/04
C 07 D 403/02
C 07 D 409/02
C 12 N 9/99

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 07 D / 331 544 5 (22) 07.08.89 (44) 21.11.91

(71) siehe (73)
(72) Neubert, Klaus, Doz. Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Born, Ilona, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Faust, Jürgen, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Heins, Jochen, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Barth, Alfred, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Demuth, Hans-Ulrich, Dr. sc. nat. Dipl.-Biochem.; Rahfeld, Jens U., Dipl.-Biochem.; Steinmetzer, Torsten, Dipl.-Biochem., DE
(73) Martin-Luther-Unviersität Halle–Wittenberg, Universitätsplatz 10, O - 4010 Halle, DE
(74) siehe (73)

(54) Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV

(55) Inhibitoren; Dipeptidyl Peptidase IV; Aminosäurederivate; heterocyclische Amidstruktur; Herstellung; kompetitive Hemmung; Therapeutika; Medizin; Immunbiochemie; pharmazeutische Industrie

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur, die die katalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Seren, in Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro kompetitiv hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse zur Anwendung kommen. Die Erfindung ist zur Anwendung in der Medizin, insbesondere in der Immunbiologie und Pathologie und für die pharmazeutische Industrie von Bedeutung.

ISSN 0433-6461

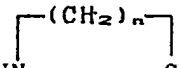
7 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV, **gekennzeichnet dadurch,** daß Aminosäureamide der allgemeinen Formel I

A–B (I)

synthetisiert werden, worin A und B wie folgt definiert sind:
A = α-Aminocarbonsäure der Struktur H_2N–CHR–COOH (R = aliphatischer, aromatischer oder heterocyclischer Rest, beispielsweise Alanin, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Prolin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure, Asparagin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Norvalin, Norleucin, Ornithin, 2,4-Diaminobuttersäure, α-Aminobuttersäure, vorzugsweise Isoleucin- jeweils in der L-Konfiguration, α-Aminoisobuttersäure, im Falle der trifunktionellen Aminosäuren auch die entsprechenden N^{ω}- oder C^{ω}- oder O- bzw. S-substituierten Derivate in der L-Konfiguration, vorzugsweise N^{ω}-Acyl, C^{ω}- bzw. O-Benzyl-Aminosäuren, beispielsweise N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, O-Benzyl-L-Serin, O-Benzyl-L-Tyrosin, L-Glutaminsäure-γ-benzylester, L-Asparaginsäure-β-benzylester sowie entsprechende, insbesondere durch Halogen, Nitro-, Hydroxy-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxy-Reste ringsubstituierte Derivate des L-Phenylalanins, L-Tyrosins, L-Tryptophans, vorzugsweise 4-Nitro-L-Phenylalanin bzw. α-Iminocarbonsäuren

der Struktur  mit n = 2,3,4 beispielsweise L-Azetidin-2-carbonsäure, L-Prolin, L-Pipecolinsäure, verwandte Verbindungen wie L-3,4-Dehydroprolin, L-Thioprolin sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, Cyano-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxyreste substituierten Derivate, beispielsweise L-4-Hydroxyprolin.
B = spezielle heterocyclische Amine oder heterocyclische Aminaldehyde: Pyrrolin, Thiazolin, Piperidin, Morpholin, Pyrazolin, Pyrazolidin, Piperazin, Oxazolin, Oxazolidin, Imidazolin, Imidazolidin, Azetidin, Aziridin vorzugsweise Pyrrolidin, Thiazolidin, L-Prolinal, L-Thioprolinal, sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro- bzw. Alkylreste substituierten Derivate und ihre Darstellung ausgehend von X–A–Y bzw. X–A(Z)–Y (im Falle einer trifunktionellen Aminosäure für A) durch Umsetzung mit B, worin A und B wie oben definiert sind, X für eine in der Peptidchemie gebräuchliche α-Aminoschutzgruppe, vorzugsweise der tert. Butyloxycarbonyl-Rest steht, Z in Abhängigkeit von der Struktur der trifunktionellen Aminosäure eine gebräuchliche Seitenkettenschutzgruppe, bevorzugt vom tert. Butyl-Typ (tert. Butyloxycarbonyl, tert. Butylester, O- oder S-tert. Butyl) darstellt, und Y Hydroxy, Aktivester, bevorzugt Pentafluorphenyl bzw. N-Hydroxysuccinimidester bedeutet nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden zur Knüpfung der Amidbindung, vorzugsweise über die Mischanhydridtechnik bzw. die Aktivestermethode erfolgt und anschließend die für X und Z eingesetzten Schutzgruppen mit den in der Peptidchemie üblichen Deblockierungsverfahren für die oben genannten Schutzgruppen vom tert. Butyl-Typ durch Acidolyse entfernt und falls erforderlich durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Sephadex G 10 oder schwach saurem Ionenaustauscher gereinigt werden.
2. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Aminosäurederivate
 - Ile-pyrrolidid,
 - Ile-thiazolidid,
 - Ile-prolinal,
 - Ile-thioprolinal,
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-pyrrolidid,
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thiazolidid,
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-prolinal
 - N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thioprolinal.

hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkpotenz bevorzugte Verbindungen darstellen.

3. Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch,** daß diese und/oder deren pharmazeutisch annehmbare Salze die katalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse für die Medizin von Bedeutung sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur. Die erfindungsgemäßen Verbindungen hemmen die katalytische Aktivität der Dipeptidyl Peptidase IV kompetitiv und können als reversible DD IV-Inhibitoren im Bereich medizinisch-biologischer Prozesse, an denen das Enzym funktionell beteiligt ist, als potentielle Diagnostika bzw. Therapeutika zur Anwendung kommen. Die Erfindung ist zur Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin, Pathobiochemie, Pharmakologie, Immunbiochemie und für die pharmazeutische Industrie geeignet.

Charakteristika des bekannten Standes der Technik

Die Dipeptidyl Peptidase IV ist ein im Säugerorganismus ubiquitär vorkommendes Enzym. Sie ist eine Serinprotease mit ausgeprägter Substratspezifität, die konsekutiv vom N-terminalen Ende einer Peptid- oder Proteinkette Dipeptide der Struktur X_{aa}-Pro und X_{aa}-Ala abspaltet, vorausgesetzt in dritter Position der Sequenz befinden sich keine Prolin- oder Hydroxyprolin-Reste (vgl. Küllertz et al., Dipeptidyl Peptidase IV – Chemie, Biochemie und physiologische Aspekte, Beiträge zur Wirkstofforschung Heft 11, Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung 1981). Neuere Befunde zeigen, daß die Dipeptidyl Peptidase IV ein physiologisch-biochemisch relevantes Enzym zu sein scheint, das an einer Reihe von Stoffwechselprozessen, u.a. der Blutdruckregulation, Blutgerinnung und Proliferationsprozessen funktionell beteiligt ist (vgl. G. Küllertz et al., Dipeptidyl Peptidase IV-Biochemie, Physiologie und Pathobiochemie, Beiträge zur Wirkstofforschung, Heft 27, Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung 1986). Bekannt ist, daß X_{aa}-Pro- bzw. X_{aa}-Ala-Dipeptide als kompetitive Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV wirksam sind, wobei ihre inhibitorische Wirkpotenz von der Struktur des N-terminalen Aminosäure X_{aa} abhängig ist. Insgesamt gesehen ist aber ihre inhibitorische Wirksamkeit nicht stark ausgeprägt (H.U. Demuth, Dissertation A, Math.-Nat. Fakultät der Universität Halle 1981). Darüber hinaus wurden kürzlich irreversible Inhibitoren (Acylenzyminhibitoren) für die Dipeptidyl Peptidase IV vom Dipeptidyl-O-Aroyl-hydroxylamin-Typ beschrieben (vgl. H.U. Demuth et al., J. Enzyme Inhibition [1988], 2, 129). Bei solchen Inhibitoren sind toxikologische Bedenken bei In-vivo-Untersuchungen nicht auszuschließen. Außerdem ist im Falle eines therapeutischen Einsatzes von DP IV-Inhibitoren der reversiblen Hemmung von Enzymaktivitäten der Vorzug zu geben.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, einfach herstellbare, hochwirksame reversible Inhibitoren für die Dipeptidyl Peptidase IV auf der Basis spezieller Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur zur Verfügung zu stellen, die als gut verträgliche Substanzen sowohl in vitro als auch in vivo die katalytische Aktivität der DP IV kompetitiv hemmen, wobei zweckgebunden in Abhängigkeit von der Molekülstruktur eine graduelle Abstufung ihrer inhibitorischen Potenz erreicht werden kann und die bevorzugt in der Medizin, sowohl im Bereich der Diagnostik als auch in der Therapie von Bedeutung sein könnten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Inhibitoren für die Dipeptidyl Peptidase IV vom Aminosäureamid-Typ zu entwickeln, die reversibel die katalytische Aktivität der DP IV hemmen und sich durch folgende Vorteile auszeichnen:

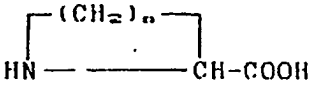
1. Einfache Molekülstruktur
2. Einfache und damit kostengünstige Herstellung
3. Gezielte Modulierung der inhibitorischen Wirkpotenz durch Strukturmodifikation
4. Günstige physikalisch-chemische Parameter im Sinne einer hohen Penetrierfähigkeit
5. Hohe Bioverfügbarkeit am Wirkort

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Aminosäureamide der allgemeinen Formel I

A–B (I)

synthetisiert werden, worin A und B wie folgt definiert sind:
A = α-Aminocarbonsäure der Struktur H_2N–CHR–COOH (R-aliphatischer, aromatischer oder heterocyclischer Rest): beispielsweise Alanin, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Prolin, Lysin, Arginin, Histidin, Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure, Asparagin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Norvalin, Norleucin, Ornithin, 2,4-Diaminobuttersäure, α-Aminobuttersäure, vorzugsweise Isoleucin- jeweils in der L-Konfiguration, α-Aminoisobuttersäure, im

Falle der trifunktionellen Aminosäuren auch die entsprechenden N^{ω}- oder C^{ω}- oder O- bzw. S-substituierten Derivate in der L-Konfiguration, vorzugsweise N^{ω}-Acyl-, C^{ω}- bzw. O-Benzyl-Aminosäuren, beispielsweise N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, O-Benzyl-L-Serin, O-Benzyl-L-Tyrosin, L-Glutaminsäure-γ-benzylester, L-Asparaginsäure-β-benzylester sowie entsprechende, insbesondere durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl- bzw. Alkoxy-Reste ringsubstituierte Derivate des L-Phenylalanins, L-Tyrosins, L-Tryptophans, vorzugsweise 4-Nitro-L-Phenylalanin, bzw. α-Iminocarbonsäuren der Struktur



mit n = 2,3,4, beispielsweise L-Azetidin-2-carbonsäure, L-Prolin, L-Pipecolinsäure, verwandte Verbindungen, wie L-3,4-Dehydroprolin, L-Thioprolin sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro-, Hydroxy-, Cyano-, niedere lineare oder verzweigte Alkyl bzw. Alkoxyreste substituierten Derivate, beispielsweise L-4-Hydroxyprolin.
B = spezielle heterocyclische Amine oder heterocyclische Aminaldehyde: Pyrrolin, Thiazolin, Piperidin, Morpholin, Pyrazolin, Pyrazolidin, Piperazin, Oxazolin, Oxazolidin, Imidazolin, Imidazolidin, Azetidin, Aziridin, vorzugsweise Pyrrolidin, Thiazolidin, L-Prolinal, L-Thioprolinal, sowie die entsprechenden durch Halogen-, Nitro- bzw. Alkylreste substituierten Derivate.
Einige als DP IV-Inhibitoren bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen sind die Aminosäurederivate:

Ile-pyrrolidid,
Ile-thiazolidid,
Ile-prolinal,
Ile-thioprolinal,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-pyrrolidid,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thiazolidid,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-prolinal,
N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-Lys-thioprolinal.

Die Darstellung der erfindungsgemäßen Aminosäureamide als reversible Inhibitoren der DP IV erfolgt ausgehend von X–A–Y bzw. X–A(Z)–Y (im Falle einer trifunktionellen Aminosäure für A) durch Umsetzung mit B, worin A und B wie zuvor definiert sind, X für eine in der Peptidschicht gebräuchliche α-Aminoschutzgruppe steht (vgl. E. Wünsch, Synthese von Peptiden in Houben Weyl Band 15/I, Methoden der organischen Chemie, Ed. E. Müller, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1974), vorzugsweise ein tert. Butyloxycarbonyl-Rest, Z in Abhängigkeit von der Natur der trifunktionellen Aminosäure eine gebräuchliche Seitenkettenschutzgruppe darstellt, bevorzugt vom tert. Butyl-Typ, d.h. für den Schutz der N^{ω}-Aminofunktion kommt der tert. Butyloxycarbonyl-Rest, für die Blockierung der ω-ständigen Carboxygruppen der tert. Butylester und für Hydroxy- bzw. Thiolfunktionen der tert. Butyl-Rest zum Einsatz und Y Hydroxy, Aktivester, bevorzugt Pentafluorphenyl- bzw. N-Hydroxysuccinimidester bedeutet, nach den in der Peptidchemie üblichen Methoden zur Knüpfung der Amidbindung nämlich N,N-Dicyclohexylcarbodiimid, N,N-Dicyclohexylcarbodiimid/Additiva (bevorzugt 1-Hydroxybenzotriazol), aktivierte Ester, Mischanhydrid, Säurechlorid (vgl. E. Wünsch s.o.) oder 2-(1 H-Benzotriazol-1-yl-)-1,1,3,3-tetramethyluroniumsalze (vgl. R. Knorr et al., Abstracts 20th Europ. Peptide Symposium Tübingen 1988) bzw. Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumsalze (vgl. A. Fournier et al., Int. J. Peptide Protein Res., 1988, 31, 86) zu den geschützten Aminosäureamiden der allgemeinen Formel II und III

X–A–B (II)

X–A(Z)–B (III)

mit A, B, X, Z in der obigen Definition.

Vorzugsweise erfolgte die Knüpfung der Amidbindung zwischen A und B über die Mischanhydridtechnik bzw. die Aktivestermethode, wobei bevorzugt N-Hydroxysuccinimid- oder Pentafluorphenylester zum Einsatz kommen. Die erhaltenen geschützten Aminosäureamide der allgemeinen Formel II und III können, falls erforderlich, durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Kieselgel oder LH-20 gereinigt werden. Nach gleichzeitiger oder nacheinander geschalteter Abspaltung der für X und Z eingesetzten Schutzgruppen mit den in der Peptidchemie üblichen Deblockierungsverfahren (vgl. E. Wünsch s.o.) für die genannten bevorzugten Schutzgruppen tert. Butyloxycarbonyl, tert. Butylester, tert. Butyl durch Acidolyse (u.a. mittels HCl/Essigsäure; HCl/Essigester; HCl/Dioxan; Trifluoressigsäure gegebenenfalls in Gegenwart von Kationenfängern) erhält man die gewünschten Aminosäureamide der allgemeinen Formel I, die, falls erforderlich, durch Umkristallisation bzw. durch Säulenchromatographie an Sephadex G 10 oder an schwach sauren Ionenaustauschern gereinigt werden können.
Die erfindungsgemäß erhaltenen Aminosäurederivate mit heterocyclischer Amidstruktur gemäß Formel I und/oder deren pharmazeutisch annehmbare Salze können als reversible Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV die katalytische Aktivität des Enzyms in gereinigter Form als auch in normalen oder pathologisch veränderten menschlichen und tierischen Seren, in Organen, Geweben und Zellen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft sowohl in vivo als auch in vitro hemmen und als potentielle Therapeutika in Bereichen, der durch die Dipeptidyl Peptidase IV regulativ gesteuerten Stoffwechselprozesse, vorzugsweise im Rahmen der Blutdruckregulation, der Blutgerinnung, der Zellproliferation, aber auch im Processing biologisch aktiver prolinhaltiger Peptide zur Anwendung kommen.
Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erklärt werden, ohne sie einzuschränken.

Ausführungsbeispiele

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:
Aminosäuresymbole entsprechend IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Biochem. J., 219, 345 (1984).

SPro	L-Thioprolin (L-Thiazolidin-4-carbonsäure)
AcOH	Essigsäure
Boc	tert. Butyloxycarbonyl
CAIBE	Chlorkohlensäureisobutylester
DC	Dünnschichtchromatogramm, -chromatographisch
DP IV	Dipeptidyl Peptidase IV
d. Th.	der Theorie
EE	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Fp	Schmelzpunkt
h	Stunde(n)
i. Vak	im Vakuum
LM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol
Min.	Minuten
NEM	N-Ethylmorpholin
OPfp	Pentafluorphenylester
pNA	4-Nitroanilid
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie, -chromatographisch
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
$Z(NO_2)$	4-Nitrobenzyloxycarbonyl

Unter „üblicher Aufarbeitung" versteht man:
Nach beendeter Kupplungsreaktion wird das jeweilige Rohprodukt in Essigester aufgenommen und die Lösung nacheinander zweimal mit Wasser (NaCl-gesättigt), dreimal mit 5%iger $KHSO_4$-Lösung, zweimal mit Wasser, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Rohprodukt durch Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum isoliert.
Folgende Laufmittelssysteme (in Volumenanteilen) zur Dünnschichtchromatographie auf Silicagel-Fertigplatten (Silufol UV 254, CSSR) wurden verwendet:

BAE	Benzen-Aceton-Essigsäure	70 + 30 + 1,5
BAW	2-Butanol-Ameisensäure-Wasser	75 + 15 + 20
BEWE	1-Butanol-Essigsäure-Wasser-Essigester	20 + 20 + 20 + 20
BPEW	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	30 + 20 + 6 + 24
CM	Chloroform-Methanol	90 + 10
EPEW	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	90 + 15 + 4,5 + 2,3

Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der erfindungsgemäß synthetisierten DP IV-Inhibitoren wurden die Ki-Werte durch Auftragung nach Dixon (in: J. Lasch, Enzymkinetik, Fischer-VLG. Jena 1987) 1/vi gegen [I] aus dem Schnittpunkt von mindestens 3 Geraden ermittelt.
vi – gemessene Initialgeschwindigkeit der DP IV-katalysierten Hydrolyse des Substrates Ala-Pro-pNA
[I] – Konzentration des als DP IV-Inhibitor untersuchten Aminosäureamides im Meßansatz
Die Messungen wurden bei *p*H 6,3 in 0,04 M Phosphatpuffer durchgeführt. Die Ionenstärke betrug 0,125, eingestellt mit Kaliumchlorid. Die Temperatur des Meßansatzes betrug 30°C. Die Bestimmung des Wertes für vi wurde bei jeder Substrat- und Inhibitorkonzentration 3fach durchgeführt.

Beispiel I

N^{ε}-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-pyrrolidid · hydrochlorid (H–Lys[$Z(NO_2)$]–N ⟨⟩ · HCl)

2,95 g Boc–Lys[$Z(NO_2)$]–OH wurden in 30 ml THF gelöst und bei –15°C mit 880 µl NEM und 900 µl CAIBE versetzt. Nach 6 Min. wurden 573 µl Pyrrolidin bei –15°C zugegeben. Man ließ 1 h bei –15°C und über Nacht bei RT rühren. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Das nach Trocknen i. Vak. erhaltene amorphe Boc–Lys[$Z(NO_2)$]–N ⟨⟩ wurde in 20 ml 1,1 N HCl/AcOH gelöst und 30 Min. bei RT gelassen. Das Produkt wurde mit Ether ausgefällt und anschließend aus MeOH/Ether umkristallisiert. Die weitere Reinigung erfolgte SC an Sephadex G 10 mit 0,1 M AcOH als Elutionsmittel.

Ausbeute:
Fp: 157–160°C
$[\alpha]_D^{20}$: +9,67° (c = 1, AcOH)
DC: einheitlich in BAW, BEWE und BPEW
Ki: $(3{,}46 \pm 0{,}5) \cdot 10^{-7}$ M

Beispiel II

L-Valin-pyrrolidid · hydrochlorid (H–Val–N ⟨⟩ · HCl)

1,086g Boc–Val–OH wurden in 20ml EE gelöst und bei –20°C mit 640µl NEM und 650µl CAIBE versetzt. Nach 8Min. fügte man 413µl Pyrrolidin zu und ließ 1h bei –20°C und über Nacht bei RT rühren. Die Aufarbeitung erfolgte wie üblich. Das ölige Boc–Val–N ⟨⟩ wurde bei RT 30Min. mit 3N HCl/EE behandelt. Nach Einengen des LM i. Vak. kristallisierte das Produkt aus EtOH/EE in farblosen Nadeln aus.

Ausbeute:	620mg (60,3% d. Th.)
Fp:	178–180°C
$[\alpha]_D^{20}$:	+33,93° (c = 1, AcOH)
DC:	einheitlich in BAW, BEWE und BPEW
Ki:	$(4{,}75 \pm 0{,}7) \cdot 10^{-7}$ M

Beispiel III

L-Isoleucin-pyrrolidid · hydrochlorid (H–Ile–N ⟨⟩ · HCl)

1,98g Boc–Ile–OPfp wurden in 15ml THF gelöst und bei 0°C mit 450µl Pyrrolidin und 280µl TEA versetzt. Man ließ 1h bei 0°C und 1h bei RT rühren. Nach Abziehen des LM i. Vak. wurde der Rückstand in EE aufgenommen und mit H_2O, $KHSO_4$-Lösung und H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der EE wurde i. Vak. abgezogen und das ölige Boc–Ile–N ⟨⟩ 30Min. bei RT mit 15ml 1,1N HCl/AcOH behandelt. Das Produkt wurde zunächst mit Ether ausgefällt, abgesaugt, im Exsikkator über KOH und P_2O_5 getrocknet und anschließend aus Isopropanol/Diisopropylether umkristallisiert.

Ausbeute:	760mg (68,8% d. Th.)
Fp:	179–184°C
$[\alpha]_D^{20}$:	+29,31° (c = 1, AcOH)
DC:	einheitlich in BAW, BEWE und BPEW
Ki:	$(2{,}43 \pm 0{,}1) \cdot 10^{-7}$ M

Beispiel IV

L-Thioprolin-pyrrolidid · hydrochlorid

IV.1. Boc–SPro–N ⟨⟩

888mg Boc–SPro–OH wurden in 10ml THF gelöst und nach Abkühlen auf –20°C unter Rühren mit 484µl NEM und 495µl CAIBE versetzt. Nach 8Min. fügte man bei –20°C 443µl Pyrrolidin hinzu, ließ die Reaktionsmischung noch 1h bei –20°C und über Nacht bei RT rühren. Danach wurde i. Vak. eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Nach Aufnehmen des öligen Rückstandes mit n-Hexan setzte Kristallisation ein.

Ausbeute:	416mg (38% d. Th.)
Fp:	108–109°C
$[\alpha]_D^{26}$:	–154,2° (c = 0,62, AcOH)
DC:	einheitlich in BAE, CM, EPEW

IV.2. H–SPro–N ⟨⟩ · HCl

265mg Boc–SPro–N ⟨⟩ wurden in 3ml 1,1N HCl/AcOH gelöst, mit 300µl Thioanisol versetzt und 30Min. bei RT stehengelassen. Anschließend engte man i. Vak. ein, versetzte den Rückstand mit Ether und kristallisierte aus $CHCl_3$/Ether um.

Ausbeute:	182mg (88% d. Th.)
Fp:	164–166°C
$[\alpha]_D^{26}$:	–122,7° (c = 0,62; AcOH)
DC:	einheitlich in BAW, BEWE, BPEW
Ki:	$(3{,}95 \pm 0{,}4) \cdot 10^{-5}$ M

Beispiel V

L-Isoleucin-thiazolidid · hydrochlorid

V.1. Boc–Ile–N ⟨S⟩

2,31g Boc–Ile–OH wurden in 10ml THF gelöst und bei –20°C unter Rühren mit 1,27ml NEM und 1,3ml CAIBE versetzt. Nach 8Min. fügte man bei –20°C 1,26g Thiazolidin-hydrochlorid und weitere 1,27ml NEM hinzu, ließ das Reaktionsgemisch noch 1h bei –20°C 1,26g Thiazolidin-hydrochlorid und weitere 1,27ml NEM hinzu, ließ das Reaktionsgemisch noch 1h bei –20°C und über Nacht bei RT rühren. Danach wurde der Ansatz i. Vak. eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Der ölige Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Ether/n-Hexan (1:1) gereinigt.

Ausbeute:	952mg (31% d. Th.)
$[\alpha]_D^{26}$ (Öl):	–14,1°C (c = 0,6, AcOH)
DC:	einheitlich in BAE, CM, EPEW

V.2. H–Ile–N  · HCl

790 mg Boc-Ile-thiazolidid wurden in 8 ml 1,1 N HCl/AcOH gelöst, mit 800 µl Thioanisol versetzt und 30 Min. bei RT stehengelassen. Danach wurde der Ansatz i. Vak. eingeengt und das Produkt mit Ether ausgefällt.

Ausbeute:	584 mg (94 % d. Th.)
Fp:	116–120 °C
$[\alpha]_D^{26}$:	+18,6° (c = 0,77, AcOH)
DC:	einheitlich in BPEW, BEWE, BAW
Ki:	$(1{,}23 \pm 0{,}2) \cdot 10^{-7}$ M

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☑ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.